

· 研究简报 ·

低声压级次声对小鼠海马齿状回区巢蛋白表达的影响

彭丽岚 牟翔 袁华 李玲 唐晨 张斐 王方聚 赵联伟 陈雷

【摘要】目的 观察低声压级次声作用不同时间后对小鼠海马齿状回区巢蛋白(Nestin)阳性表达的影响。**方法** 采用随机数字表法将 60 只雄性 BALB/c 小鼠分为次声作用组及对照组。次声作用组小鼠给予低声压级(次声频率为 8~12 Hz,次声强度为 60~80 dB)次声干预,每天持续 1 h;对照组小鼠亦于相同时间点给予假次声干预。2 组分别于次声作用 1 d、7 d、14 d、21 d 及 28 d 时各取 6 只小鼠处死并取脑,采用免疫荧光染色法观察次声作用不同时间后 2 组小鼠海马齿状回区 Nestin 表达情况。**结果** 次声作用组经次声作用 1 d 及 7 d 后,发现小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量与同时点对照组间差异无统计学意义($P>0.05$);经次声连续作用 14 d 时,发现小鼠 Nestin 阳性细胞数量明显增加,与次声作用 1 d 时及对照组间差异均具有统计学意义($P<0.05$);经次声作用 21 d 时,发现小鼠 Nestin 阳性细胞数量有所降低,但与次声作用 14 d 时差异无统计学意义($P>0.05$);经次声作用 28 d 时,发现小鼠 Nestin 阳性细胞数量继续降低,此时与对照组间差异亦无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 低声压级次声干预可促使小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性表达增加,这可能是低声压级次声有助于情绪改善的生物学机制之一。

【关键词】 次声; 小鼠; 海马; 巢蛋白

次声是指频率低于 20 Hz 的弹性波,广泛存在于自然界及人们日常工作、生活环境中。以往研究证明高强度次声作用于人体可引起头晕、目眩、疲乏、无力、恶心呕吐、焦躁不安、工作效率下降等不良反应,破坏神经系统调节功能^[1]。有学者认为,低强度、小剂量次声干预对人体具有正面效应,可改善情绪及精神状态,如海浪拍击海岸时可产生 10 Hz 左右次声,容易使人精神振奋^[2-3]。本研究拟通过观察低声压级次声(次声频率为 8~12 Hz,次声强度为 60~80 dB)作用不同时间后对小鼠海马齿状回区巢蛋白(Nestin)阳性表达的影响,以初步探讨低声压级次声对脑组织的作用机制。

材料与方法

一、主要实验仪器

本研究所用 Infrasonic 9 型次声治疗仪由美国 CHI 公司研制,便携式野外低频信号实时测试智能分析系统由第四军医大学等单位研制。

二、实验动物分组与处理

共选取健康雄性 BALB/C 雄性小鼠 60 只,体重 18~20 g,由第四军医大学实验动物中心提供,分笼饲养于安静(环境基础噪音不高于 40 dB)环境下,标准饲料喂养,自由饮水。采用随机数字表法将上述小鼠分为次声作用组及对照组。次声作用组小鼠每天暴露于次声治疗仪下(次声频率为 8~12 Hz,次声强度为 60~80 dB)1 h;对照组小鼠亦于相同时间点置于次声治疗仪下 1 h,但期间次声治疗仪无能量输出。

三、标本取材

次声作用组及对照组分别于次声作用 1 d、7 d、14 d、21 d

及 28 d 时各取 6 只小鼠灌注取材。具体操作如下:按每千克体重 50 mg 戊巴比妥(浓度为 1%)行腹腔注射麻醉,待麻醉剂生效后迅速开胸经左心室至升主动脉插管,经 40 ml 生理盐水洗去血液后,再用 100 ml 4% 多聚甲醛液灌注固定 1 h,取脑组织经 4% 多聚甲醛后固定 2 h,置于 20% 蔗糖溶液(4℃)中直至沉底。取含海马部位的全脑组织置于冰冻切片机上行连续冠状切片,片厚 30 μm,随后置入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中待检,隔五取一,进行免疫荧光染色。

四、免疫荧光染色及图像分析

将各组小鼠切片置入 0.3% 甲醇双氧水中反应 15 min,再置入含 0.3% Triton X-100 的 PBS 液中室温下浸泡 30 min,依次加入小鼠抗 Nestin 抗体(1:200,美国 Chemicon 公司出品)4℃ 孵育 48 h,再置入含驴抗鼠 IgG(FITC 标记,1:500,美国 Invitrogen 公司出品)的荧光二抗稀释液中,于室温环境下避光保存 2~4 h。以上每步骤中间均用 0.01 mol/L PBS 液充分漂洗 3 次,每次 10 min。阴性对照选用一抗稀释液(由 1% 小牛血清白蛋白、0.3% Triton X-100 及 0.01 mol/L PBS 液组成, pH 值为 7.4)替代孵育,其它反应步骤同上。待上述处理结束后,各组小鼠标本切片经漂洗裱片、晾干、封固后置于荧光显微镜下观察并采集图像数据。所有阴性对照切片均未见阳性染色。每只小鼠取 3 张海马部位切片,将其置于高倍镜下(×400 倍)选取 3 个视野,计数海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量。

五、统计学分析

本研究所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,选用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据处理,各组数据组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

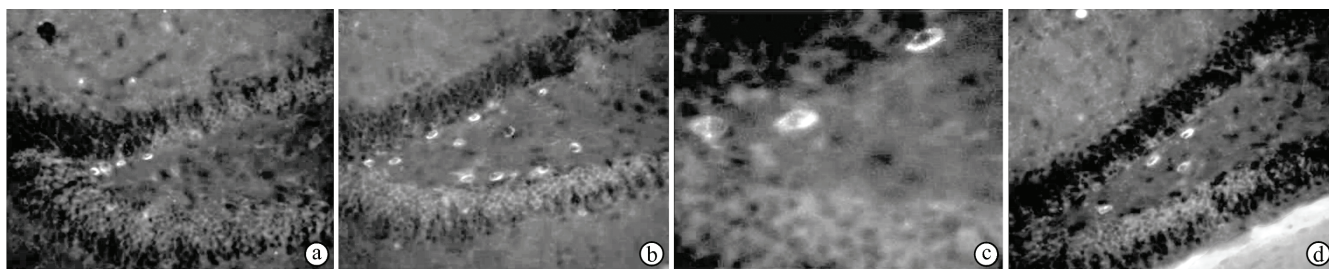
结 果

对照组小鼠海马齿状回区即可见 Nestin 阳性表达,呈绿色,阳性细胞主要为圆形、椭圆形,无突起或只有 1 个突起,胞核不明显,详见图 1a。次声作用组经次声作用 1 d 及 7 d 后,发

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.011.018

基金项目:国家自然科学基金项目(30970674)

作者单位:264001 烟台,解放军济南军区烟台疗养院理疗科(彭丽岚、唐晨、王方聚、张斐、陈雷、赵联伟);第四军医大学西京医院康复与理疗科(牟翔,袁华);北京解放军总医院第一附属医院康复理疗科(李玲)



注:a 为对照组(×400);b 为次声作用 14 d 时(×400);c 为次声作用 14 d 时(×1000);d 为次声作用 28 d 时(×400)

图 1 次声作用不同时间后各组小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性表达分析(免疫荧光染色)

现小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量与同时点对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$);经次声连续作用 14 d 时,发现小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量明显增加,与次声作用 1 d 时及同时点对照组间差异均具有统计学意义($P < 0.01$),详见图 1b、1c;经次声作用 21 d 时,发现小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量有所下降,但与次声作用 14 d 时差异无统计学意义($P > 0.05$);经次声作用 28 d 时,发现小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量继续下降,此时与对照组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$),详见图 1d。对照组小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞数量在各观察时间点组内差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。具体结果见表 1。

表 1 次声作用不同时间后 2 组小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性细胞表达结果比较(个/每高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	次声作用 1 d 时	次声作用 7 d 时	次声作用 14 d 时	次声作用 21 d 时	次声作用 28 d 时
对照组	30	1.2±0.8	1.4±0.9	2.0±1.0	2.2±0.4	1.8±0.9
次声作用组	30	1.6±0.9	2.6±1.1	8.6±1.8 ^{ab}	8.2±1.6 ^{ab}	2.2±1.1

注:与对照组相同时间点比较,^a $P < 0.01$;与次声作用 1 d 时组内比较,^b $P < 0.01$

讨 论

相关研究表明,小剂量次声对生物体具有轻微共振效应,可起到一种深部按摩作用;同时临床上已采用适当频率及声压级的次声辅助治疗角膜炎及小儿厌食症等,均取得一定疗效^[4]。相关动物实验也发现,盲肠挤压伤 Sprague-Dawley (SD) 大鼠经次声干预后,其肠粘连形成较对照组明显减少^[5];并且低声压级次声还对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[6]。以上研究均表明,低声压级次声可对生物体产生正面效应,但其具体作用机制还在不断探索中。

本研究所用 Infrasonic 9 型次声治疗仪由美国 CHI 公司研制,在美国该治疗仪主要用于缓解紧张情绪,并辅助治疗创伤、瘢痕、炎症等疾患,具有促进血液循环、扩张血管、减少纤维性瘢痕增生、加速伤口愈合^[7]、增强免疫力及镇静催眠等功效,在临床上已得到广泛应用。本实验拟通过 Infrasonic 9 型次声治疗仪给予小鼠次声辐射,并采用免疫荧光化学染色法观察次声作用不同时间后小鼠海马齿状回区 Nestin 表达变化,从而探讨低声压级次声对脑组织的作用机制。

巢蛋白(Nestin)属于一种胚胎性中间丝蛋白,主要定位于细胞质内^[8]。Nestin 除了在神经前体细胞、成肌细胞以及某些具有分化和增殖能力的细胞中表达外,在已分化的神经元中也

有表达^[9]。相关研究表明,SD 雄性大鼠在出生后 3 周时海马内即出现 Nestin 阳性神经元,直到 12 月龄时海马内仍有 Nestin 阳性神经元存在,并且这段时间内海马 Nestin 阳性神经元在形态及分布形式上基本相同,大多分布于 CA1、CA2 及 CA3 区,齿状回区可见 Nestin 阳性神经前体细胞存在,但未见到 Nestin 阳性神经元^[9]。本研究结果显示,对照组及次声作用组小鼠在次声干预 1 d 时其海马齿状回区即可出现 Nestin 阳性表达,但阳性细胞数量较少,次声作用组于次声干预 14 d 时 Nestin 阳性细胞数量明显增多,在次声干预 21 d 时阳性细胞数量有所下降,在次声干预 28 d 时达到最低值,此时 Nestin 阳性细胞数量与对照组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。提示低声压级次声干预可刺激小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性表达,且其表达强度在一定时间范围内随着次声作用次数增多。

海马是边缘系统的重要组成部分,参与机体情绪、学习和记忆、行为、免疫等多项功能的调节^[10]。Nestin 是目前识别神经干细胞的重要标志蛋白,已被广泛用来标记神经干细胞。近年来相关研究发现神经干细胞对机体记忆、情绪等功能具有重要调节作用,能提高海马神经元再生能力,改善焦虑、抑郁病情^[11]。以往研究证明低强度次声可使人精神振奋,同时还具有镇静、安眠作用,结合本实验结果分析,可能与低声压级次声促进海马齿状回区 Nestin 阳性表达有关。

刘朝晖等^[12]研究表明,8 Hz,90 dB 或 130 dB 次声作用一定时间后海马细胞凋亡率明显增高,但随着次声作用时间延长,其凋亡率逐渐下降,提示海马细胞对次声作用产生了适应性。本研究也观察到类似现象,如随着次声作用次数增多,小鼠海马 Nestin 阳性表达呈现先增高、后降低趋势,于次声干预 28 d 时其 Nestin 阳性表达与对照组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$),推测是低声压级次声长时间干预使机体产生适应所致。

综上所述,本研究结果表明,低声压级次声干预能促进小鼠海马齿状回区 Nestin 阳性表达增强,这可能是低声压级次声发挥情绪调节作用的生物学机制之一,至于低声压级次声对海马齿状回功能的影响还需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 裴兆辉,陈景藻,朱妙章,等. 次声对人类的影响. 中国自然医学杂志,2004,6:125-127.
- [2] Arabadzhi V. Infrasound and biorhythms of the human brain. Biofizika, 1992,37:150-151.
- [3] Sidorenko EI. Experience of clinical use infrasound pneumomassage in

- the treatment of progressive myopia in schoolchildren. *Vestn Oftalmol*, 1997, 113:18-20.
- [4] Filatov VV, Sidorenko EI, Alimova IuM. The treatment of bacterial keratitis with infrasound and its effect on reparative process in the cornea. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1999, 89:96-97.
- [5] Colasante DA, Au Fc, Sell HW, et al. Prophylaxis of adhesions with low frequency sound. *Surg Gynecol Obstet*, 1981, 153:357-359.
- [6] 李川, 范建中, 吴红瑛. 低声压级次声对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响. *中国康复医学杂志*, 2009, 24:419-422.
- [7] 蒋雪清, 邓芳, 李瑞满. 低声压级水平次声对初产妇盆底损伤治疗的研究. *中国医药导报*, 2011, 8:52-54.
- [8] 李东培, 汪华侨, 姚志彬. 巢蛋白表达模式及其功能. *解剖学研究*, 2004, 26:216-218.
- [9] 汪建民, 阮奕文, 姚志彬. 巢蛋白在成年大鼠海马神经元的表达及巢蛋白阳性神经元的生后发育. *神经解剖学杂志*, 2000, 16:330-332.
- [10] 肖娟娟. 应激对成年海马神经发生的影响. *咸宁学院学报*, 2008, 22:359-362.
- [11] Sahay A, Scobie KN, Hill AS, et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 2011, 472:466-740.
- [12] 刘朝晖, 陈景藻, 李康樗, 等. 不同声压级次声对大鼠海马细胞凋亡的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26:148-150.

(修回日期:2012-09-02)

(本文编辑:易 浩)

· 外刊摘英 ·

Cognitive function in severe asymptomatic carotid stenosis

Asymptomatic stenosis of the internal carotid artery is defined as significant atherosclerosis without stroke or transient ischemic attack. While previous studies have noted an association between this stenosis and cognitive impairment, little is yet known concerning how these cognitive alterations are related to disruptions in brain connectivity. This study evaluated structural and functional connectivity, as they relate cognitive impairment among patients with severe asymptomatic carotid stenosis.

This study included 17 patients with severe, unilateral stenosis of the internal carotid artery, defined as greater than 70% stenosis on the ipsilateral side and less than 50% stenosis on the contralateral side. Twenty-six individuals with less than 50% stenosis of large cerebral arteries were recruited as controls. Outcome measures included the dizziness handicap inventory, the Mini Mental State Examination, the Taiwan Geriatric Depression Scale, working memory, verbal memory, attention, executive function and a complex visual spatial perception test. Diffusion tensor imaging and resting state functional connectivity magnetic resonance imaging (fcMRI) data were obtained for all subjects.

Compared with controls, the cases had significantly greater severe dizziness scores ($P < 0.001$) and poorer cognitive performance on the working memory and verbal memory tests ($P = 0.03$ and $P = 0.01$, respectively). The case group had significantly reduced whole-brain mean fractional anisotropy and functional connectivity, particularly in the interhemispheric fronto-parietal network (between bilateral dorsal lateral prefrontal cortices and bilateral anterior inferior parietal lobules) and the intrahemispheric fronto-parietal network (dorsal lateral prefrontal cortices-anterior inferior parietal lobules ipsilateral to the stenosis) and the default mode network (PCC-hippocampus and PCC-medial prefrontal cortex). The whole brain FA was correlated with the Symbol Digit test scores of attentional function ($P = 0.005$) and immediate recall scores of verbal memory function ($P = 0.03$) in patients, but not in controls.

Conclusion: This study of patients with asymptomatic carotid stenosis found patterns of brain network disruption which correlated with symptoms of dizziness and impaired cognitive performance.

【摘自:Cheng HL, Lin CJ, Soong BW, et al. Impairments in cognitive function and brain connectivity in severe, asymptomatic carotid stenosis. *Stroke*, 2012, 43:2567-2573.】

Wheelchair wheel size and performance

Wheel size affects the rolling resistance of the wheelchair user, with greater resistance experienced with smaller wheels at a given velocity. Other aspects of wheel size and hand-rim diameter have also been found to affect performance in wheelchair racing. This study further explored the effects of wheel size with fixed gear ratios on maximal effort mobility performance of wheelchair basketball players.

Thirteen, well-trained wheelchair basketball players, with an average age of 24 years, were tested in an adjustable sports wheelchair with three different wheel sizes, including 24, 25 and 26 inches. The hand rim diameters of each of these chairs were 0.59 m, 0.61 m and 0.65 m. The athletes performed three field tests, including a 20 m sprint, a linear mobility drill and an agility drill.

The time to perform each test was used to assess performance of the different wheel conditions. For the 20 m sprint, the 0.65 m condition produced significantly faster times than did the 0.59 m condition ($P = 0.029$). Significantly fewer pushes were employed in the 0.65 m condition as compared to the 0.59 m condition ($P = 0.033$). Time to perform linear mobility or agility drills was not significantly affected by wheel size.

Conclusion: This study of wheelchair athletes found that a 0.65 m wheel improved maximal effort sprinting performance without adversely affecting initial acceleration or maneuverability, as compared to smaller wheel size.

【摘自:Mason B, van der Woude L, Lenton JP, et al. The effect of wheel size on mobility performance in wheelchair athletes. *Int J Sports Med*, 2012, 33:807-812.】